

Artigo originariamente publicado na
Revista Médica da Aeronáutica, número 1, março de 1949

FOSFATASE ÁCIDA DO SÔRO

GILBERTO GUIMARAES VILLELA

(Chefe da Divisão de Química e Farmacologia do Instituto Osvaldo Cruz)

No sôro sanguíneo normal existem enzimas denominadas fosfatases que hidrolizam os estêres fosfóricos libertando o fósforo inorgânico. A dosagem do fósforo permite avaliar a atividade da fosfatase. Nos tecidos animais e nos tumores (sangue, urina, leite) só foram assinaladas as fosfomonoesterases que são fosfatases atuando sôbre os monoestêres do ácido ortofosfórico.

O pH do meio é um dos fatores que permitem separar as fosfatases em dois grupos : fosfatases alcalinas e fosfatases ácidas, conforme o pH ótimo em que a atividade é máxima. As fosfatases ditas alcalinas hidrolizam o beta-glicero-fosfato de sódio no pH 8.5 a 9.0 e são inativadas pelo iônio magnésio. A fosfatase alcalina sofre variações sensíveis nas doenças ósseas sobretudo na osteíte deformante e no raquitismo (1). Nas doenças ósseas com lesões osteoplásticas os valores da fosfatase se elevam, ao passo que são normais, quando as lesões são osteolíticas (Woodard e Higinbotham).

As fosfomonoesterases com o ótimo do lado ácido são conhecidas como fosfatases ácidas (Folley e Kay) (2). Acreditam Gutman e Gutman, que nos casos de carcinoma prostático, a enzima fabricada em excesso pelo tumor é que é lançada à circulação. Nos tecidos (fígado e baço) foi Davis quem primeiro observou a presença de uma fosfatase com ótimo em pH 4-5.

Kutscher encontrou esta enzima na urina e Kutscher e Wolbergs verificaram que na próstata a quantidade é muito mais elevada do que em qualquer outro tecido do organismo (3).

O pH ótimo da fosfatase de próstata é de 4.65 a 37°C. Os substratos usados foram o fenilfosfato, o alfa e o beta-gli-

cerofosfatos e o hexosedifosfato, sendo que só os três primeiros é que são utilizados para a dosagem da fosfatase.

Na próstata a fosfatase alcalina existe em muito pouca quantidade. No tecido carcinomatoso da próstata, tanto no tumor primário como nas metastases do esqueleto, encontra-se também elevação da fosfatase ácida. No sôro dos doentes portadores de carcinoma prostático com metastases de osso (osteolítica ou osteoplástica) os valores para a fosfatase ácida são altos (Gutman e Gutman, Müller). Na doença de Paget há interêsse em se conhecer qual a natureza da fosfatase, como mostrou Kay, visto a fosfatase alcalina se elevar enormemente nêstes casos ao passo que a fosfatase ácida se manter dentro dos limites normais (Gutman, Gutman e Müller) (4).

Em 19 casos de carcinoma prostático com metastases no esqueleto, Robson, Gutman e Gutman obtiveram aumento da fosfatase ácida em 16 dêles. Entretanto, nos casos sem metastases ósseas, confirmadas pelo exame radiológico, a fosfatase ácida apresentou-se normal. Parece bem demonstrado pelos casos publicados por vários autores de que a dosagem de fosfatase ácida é de utilidade no diagnóstico do carcinoma prostático com metastases ósseas.

Os homônios sexuais masculinos, influenciam sensivelmente no homem a evolução dos neoplasmas da próstata. Tem-se verificado que esta influência é acompanhada pela diminuição da atividade da fosfatase ácida do sôro (Huggins, Stevens e Hodges) (5) (6). Em 21 casos de carcinoma prostático com castração bilateral, observados por Huggins e colaboradores, 15 mostraram melhoras e baixa da fosfatase ácida. Parece portanto, que os hormônios masculinos frenam a evolução do câncer prostático.

Entretanto, Buchwald e Hudson não conseguiram obter modificação na fosfatase ácida do sôro de animais tratados pelo propionato de testosterona (7).

Os valores normais para a fosfatase ácida do sôro vão de 0 a 1,5 unidades, para 100 ml expressas em mg de fósforo inorgânico libertado. Shinowara, Jones e Reinhart em 20 adultos normais e 140 contrôlos, encontraram a variação de 0 a 1,1 unidades (8). A unidade de fosfatase é definida como a quantidade de fósforo inorgânico libertado em mg durante 1 hora a 37°C, no pH de 5.0 + 0,15 e com o beta-glicero-

fosfato como substrato. Esta definição é semelhante a de Bodansky, Levene e Dillon empregada para a fosfatase alcalina.

Na doença de Paget os valores para a fosfatase ácida não excedem em geral 2.5 unidades, ao passo que podem chegar a 40 e mesmo 100 unidades para a fosfatase alcalina. Usando-se o fenilfosfato como substrato, segundo a técnica de King e Armstrong, normalmente a atividade fosfatásica ácida produz uma libertação de fenol não ultrapassada de 5 mg. para 100 ml (0.5 a 2.0 unidades). No carcinoma prostático êsses valores atingem 30 a 40 mg. para 100 ml (Gutman e Gutman).

Nos casos normais por nós dosados com o emprêgo do beta-glicerofosfato em pH 5.0 obtivemos de 0 a 2.0 unidades para 100 ml.

Observamos valores pouco superiores em dois casos de osteíte deformante (3.3 a 4.2 unidades respectivamente). Em 3 casos de carcinoma prostático, dois mostraram valores elevados (5.2 e 6.8 unidades) mas que voltaram ao normal após a retirada cirúrgica do tumor. Nêstes casos não existiam metastases e o prognóstico foi favorável.

O terceiro caso apresentou valores normais ou levemente aumentados (2.0 — 2.8 — 2.5), verificando-se mais tarde tratar-se de um tumor benigno não metastático.

Robson, Gutman e Gutman encontraram nos casos de carcinoma prostático, com evidência radiológica da metástase ósseas, as variações de 1.6 a 2.60 unidades para a fosfatase ácida. Em casos de neoplasma com metastases do esqueleto de origem não prostática os valores foram normais (1.1 a 4.2 unidades) (9). Nos casos de carcinoma prostático sem diagnóstico radiológico de mestastases ósseas não existe elevação da fosfatasemia. Não parece haver relação entre a extensão das lesões metastáticas ósseas e a atividade fosfatásica, como também entre a fosfatase alcalina e a ácida. O aumento da fosfatase ácida implica na provável disseminação do tumor primário, sendo portanto de prognóstico desfavorável. O tumor metaplástico continua a produzir a enzima da mesma forma do que no tecido prostático originário.

Pelo exame microquímico, Gomori conseguiu estudar a distribuição da fosfatase ácida e alcalina nos tecidos. Assim, verificou êle de que as hemátias não apresentam a enzima ácida apesar dos métodos químicos terem-na eviden-

ciado (10). A técnica usada por Gomori consiste na fixação do tecido no gelo ou acetona. Inclusão em parafina, incubação com nitrato de chumbo e beta-glicerofosfato no pH 5.0. Nas zonas contendo a enzima aparece um precipitado de fosfato de chumbo que se transforma pela ação do sulfureto de amônio diluído, em sulfureto de chumbo de cor negra.

A próstata e o baço são os órgãos mais ricos quando estudados pela técnica microquímica. A distribuição da fosfatase ácida nos tecidos é muito diversa da que se verifica para a fosfatase alcalina.

A dosagem da fosfatase ácida no soro pode ser feita pela técnica de King e Armstrong ou pela de Bodansky modificada.

Com a técnica de Bodansky a única modificação a fazer consiste na acidificação do substrato para o pH 5.0. Em nosso laboratório costumamos adicionar ácido acético puro glacial ao substrato na proporção de 0,05 ml para 10 ml do substrato. Nesta quantidade o pH fica em 5.0. Convém entretanto, fazer ensaios prévios afim de verificar se o pH não se afasta mais de 0,2 é 4.8 a 5.2.

O soro é incubado com o substrato ácido durante 1 hora e por fim precipitado pelo ácido tricloroacético. Todos os demais detalhes são idênticos aos da dosagem da fosfatase alcalina pela técnica de Bodansky (1).

No caso de se usar o fenilfosfato, a técnica de King e Armstrong modificada por Gutman e Gutman é a preferível. Como esta técnica se acha pouco divulgada entre nós, passaremos a descrevê-la em detalhe.

Reativos :

- 1 — Substrato : monofenilfosfato a 0,005 M dissolvidos em citrato de sódio a 0,1 M. A solução deve ficar no pH de 4.9 — 5.0. Este ester é obtido com o nome de "disodium phenylphosphate" da casa Eimer e Amed de Nova Iork. Dissolve-se 1.9 g. do fenilfosfato em 500 ml de água e junta-se 500 ml da solução de citrato que se prepara dissolvendo-se 42 g. de ácido cítrico cristalizado em pouca água e adicionando-se 376 ml de soda normal. Completa-se 1000 ml e ajusta-se o pH para 4.9 com HCl ou NaOH, caso seja necessário.

FOSFATASE ÁCIDA DO SORO

59

- 2 — Reativo fenólico de Folin e Ciocalteu que se dilue na proporção de 1:3 no momento de usar.
- 3 — Solução de carbonato de sódio a 20%.
- 4 — Solução padrão de fenol. Dissolve-se 1 g. de fenol cristalizado em HCl 0,1N e completa-se 1 litro com HCl 0,1N.

Pode-se padronizá-lo pela técnica de Koppeschaar (segundo Treadwell e Hall — Analytic Chemistry). É estável. Faz-se uma diluição de modo que 100 ml contenham 10 mg. de fenol. Esta diluição fica estável na geladeira até 2 meses.

- 5 — Solução de fenol e reativo fenólico. Toma-se 1 ml da solução diluída de fenol e juntam-se 6 ml de água e 3 ml do reativo fenólico. Prepara-se no momento da dosagem.

Técnica :

Em 2 tubos de ensaio colocam-se 10 ml do substrato que se deixa no banho-maria a 37°C durante 5 minutos. Pipeta-se 0,5 ml de soro (límpido e não hemolizado) para cada um dos tubos. Mistura-se bem e deixa-se no banho-maria durante 3 horas. Após este tempo retira-se do banho e juntam-se 4,5 ml do reativo fenólico.

Em 2 outros tubos tomam-se 10 ml do substrato e junta-se 0,5 ml do soro e 4,5 ml do reativo fenólico.

Pipetam-se 6 ml dos líquidos a analisar e dos controles e junta-se 1,5 ml de carbonato de sódio a 20%.

A solução padrão diluída de fenol juntam-se 2,5 ml do carbonato. Deixam-se os tubos no banho-maria durante 5 minutos para que a cor se desenvolva completamente. Compara-se no fotocolorímetro ou num colorímetro Dubosq após 1 hora. Lê-se no colorímetro estando a amostra em 30 mm. O valor do fenol em mg. subtraído do valor do controle dará o fenol libertado numa hora de incubação.

Para calcular o fenol em mg. para 100 ml de soro antes e depois da hidrólise aplica-se a fórmula :

$$\frac{\text{Leitura no padrão}}{\text{Leitura na amostra}} \times \text{valor do padrão} \times \frac{\text{volume da amostra}}{\text{volume do padrão}} \times \frac{100}{\text{ml do soro}}$$

O padrão sendo comparado com o sôro é subtraído do valor do padrão comparado com o sôro incubado.

No caso de sôros ricos em fosfátase deve-se diluí-los com solução salina a 0,85% e encurtam o tempo de hidrolise para 15 ou 30 minutos.

Normalmente obtem-se de 0.5 a 2.0 unidades para 100 ml de sôro.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — VILLELA (G.G.) e HARGREAVES (A.) — Fosfátases do sôro — O Hospital, 15, 297, 1939.
- 2 — FOLLEY (S.) e KAY (H.) — Erg. Enzymforsch. 5, 159, 1936.
- 3 — KUTSCHER (W.) e WOLBERGS (H.) — Zeit. physiol. Chemie. 236, 237, 1935.
- 4 — GUTMAN (E.B.), GUTMAN (A.B.) e ROBINSON (J.N.) — Am. J. Cancer. 38, 103, 1940.
- 5 — HUGGINS (C.), STEVENS (R.S.) e HODGS (C.V.) — Arch Surg. 43, 209, 1941.
- 6 — STERN (K.) e WILHEIN (R.) — The Biochemistry of Malignant tumores, 1943 p. 368.
- 7 — BUCHWALD (K.W.) e HUDSON (L.) — Endocrinol. 35, 73, 1944.
- 8 — SHINOWARA (G.), JONES (L.M.) e REINHART (H.) — J. Biol. Chem, 142, 921, 1942.
- 9 — ROBINSON (J. N.), GUTMAN (E.B.) e GUTMAN (A.B.) — J. Urology, 42, 602, 1939.
- 10 — GOMORI (G.) — Jour. Cell. Comp. Physiol. 17, 71, 1941.
- 11 — GUTMAN (E.B.) e GUTMAN (A.B.) — Jour. Biol. Chem. 136, 201, 1940.

(Recebido para publicação em 1-VI-1945).